

ETUDE CONCERNANT L'INFLUENCE DE LA CONSTITUTION
GENETIQUE SUR LA LONGUEUR DES LARVES
D'*HETERODERA ORYZAE*

PAR

C. NETSCHER et J. PERNES

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer Centre de Dakar, Hann, Sénégal

Des larves appartenant à deux masses d'oeufs (C et D) ont été inoculées séparément sur riz. De cette façon un certain nombre de filles de C et D ont été obtenues qui ont été fécondées par leurs frères. Répétant ce processus pendant trois générations, 25 lignées endogamiques ont été établies, cinq originaires de C et 20 de D.

Des mesures de larves appartenant à ces lignées ont démontré que leur longueur était partiellement déterminée par des caractères héréditaires et que dans la descendance de chaque fondateur les grand-mères des individus mesurés présentaient une diversité génétique pour ce caractère. La diversité la plus importante réside entre les groupes de femelles d'origines différentes.

Le milieu est responsable d'environ 50% de la variabilité de longueur des larves. Des mesures faites sur des individus de la sixième génération d'endogamie démontrent que dès la cinquième génération il ne reste guère de variabilité génétique résiduelle.

La différenciation des espèces de nématodes repose sur des caractères extrêmement variés, en général morphologiques. Mais le systématien est bien souvent obligé d'avoir recours, au moins dans une certaine mesure, à des caractères biométriques. Il se heurte alors au problème de la définition des „limites” de l'espèce, c'est à dire de l'étendue des variations biométriques que, tout à fait empiriquement, il peut raisonnablement admettre à l'intérieur d'une même unité taxonomique. Les limites biométriques d'une espèce s'étendent au fur et à mesure que celle-ci est retrouvée dans un plus grand nombre de sites de plus en plus dispersés et de plus en plus éloignés les uns des autres. Les caractères biométriques de deux populations de la même espèce trouvées dans deux sites et, peut être dans deux biotopes différents, pourront présenter entre eux des différences parfois importantes. On parlera alors, de „variations géographiques” concept assez flou et qui mériterait d'être précisé.

Le fait que deux populations de la même espèce vivant dans deux lieux plus ou moins éloignés présentent des différences biométriques peut avoir deux causes:

- 1°. Les lignées existant dans les deux sites sont intrinsèquement différentes quant à leur biométrie (variation génétique)
- 2°. Les différences biométriques constatées sont dues à l'action de deux biotopes différents (variation due au milieu).

En fait ces deux causes doivent toujours agir conjointement sans qu'on puisse savoir, a priori, laquelle est la plus importante.

12 MAI 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 5433

Nematodes?
Bios/T/mel?

Les travaux qui vont être exposés ci-dessous avaient pour but, dans le cas d'une espèce amphimictique: *Heterodera oryzae* Luc & Berdon, 1961, d'essayer de déterminer les rôles de la constitution génétique sur la variabilité de la longueur des larves du deuxième stade de cette espèce, en étudiant cette variabilité dans des lignées endogamiques ayant deux origines différentes et en interprétant les résultats à l'aide de l'analyse de variance.

MATERIEL ET METHODES

Chaque lignée d'*Heterodera oryzae* a été obtenue en inoculant, sur un jeune semis de riz (var. Moroborekan) cultivé en pot de 12 cm de diamètre, toutes les larves provenant de l'éclosion obtenue à partir d'une seule masse d'oeufs.

Après 25 jours les plantes étaient prélevées, les racines soigneusement lavées et les masses d'oeufs d'*Heterodera* transférées dans une solution 0,3 molaire de NaCl. Les masses d'oeufs étaient gardées dans cette solution pendant sept jours, puis mise à éclore dans l'eau. La solution saline empêche l'éclosion des oeufs (Dropkin et al., 1958), alors que les embryons continuent leur développement. De cette façon, dès que les masses d'oeufs sont plongées dans l'eau, l'éclosion est abondante et rapide et la plupart des larves peut être obtenue en quelques jours.

Les masses d'oeufs provenant de femelles soeurs étaient toujours gardées ensemble. Les masses d'oeufs contenant un nombre d'oeufs particulièrement élevé étaient choisies pour l'entretien des lignées. C'est sur ce seul critère qu'était choisi l'individu destiné à maintenir les lignées. A partir de la troisième génération les autres masses d'oeufs, qui n'étaient donc pas utilisées pour l'entretien des lignées étaient mises à éclore ensemble. Ensuite les larves étaient tuées en bloc (Netscher, 1970) selon la méthode de Seinhorst avec du F.P. 4 : 1, chaud (Netscher & Seinhorst, 1969), puis fixées au formol à 4%. Après avoir séjourné pendant trois jours dans le formol, 30 larves de chaque lignée étaient montées dans la glycérine suivant la technique rapide de Seinhorst (1959).

L'axe longitudinale de chaque larve a été tracé à l'aide d'une chambre claire (grossissement 200 ×). Les courbes obtenues étaient mesurées à l'aide d'un curvimètre. Les longueurs des larves mesurées furent arrondies au μ .

Les 25 lignées avec lesquelles les expériences ont été effectuées, furent obtenues de la manière suivante: d'un système radriculaire de riz parasité par *H. oryzae*, cinq femelles (désignées respectivement A, B, C, D et E) avec leurs masses d'oeufs correspondantes furent prélevées. Les larves issues de ces femelles furent inoculées sur riz et 25 jours plus tard les masses d'oeufs ont été prélevées.

Dans la première génération, deux femelles ont été choisies pour servir à établir la génération suivante. L'une (désignée C_{I-9}) provenait de la descendance de C, l'autre (D_{I-2}) de celle de D.

A la seconde génération, cinq femelles ont été choisies pour continuer l'élevage. L'une (C_{II-9-3}) provenait de la descendance de C_{I-9} , les quatre autres (D_{II-2-5} , $D_{II-2-18}$, $D_{II-2-22}$, et $D_{II-2-29}$) étaient filles de D_{I-2} .

Dans la descendance de chacune de ces cinq lignées, cinq femelles ont été retenues pour constituer 25 lignées à la troisième génération.

Elles étaient désignées:

- $C_{III-9-3-1}$ à $C_{III-9-3-5}$
- $D_{III-2-5-1}$ à $D_{III-2-5-5}$
- $D_{III-2-1-8-1}$ à $D_{III-2-18-5}$
- $D_{III-2-22-1}$ à $D_{III-2-22-5}$
- $D_{III-2-29-1}$ à $D_{III-2-29-5}$

Pour obtenir une quatrième génération, une femelle a été prise dans chacune des 25 lignées de la troisième génération. Ces lignées étaient appelées $C_{IV-9-3-1}$, $C_{IV-9-3-2}$, etc. Le tableau N° 1 donne le schéma de la généalogie des lignées employées.

Comme il a été décrit ci-dessus, à partir de la troisième génération les masses d'oeufs qui ne furent pas utilisées pour le maintien de chaque lignée ont été mises à

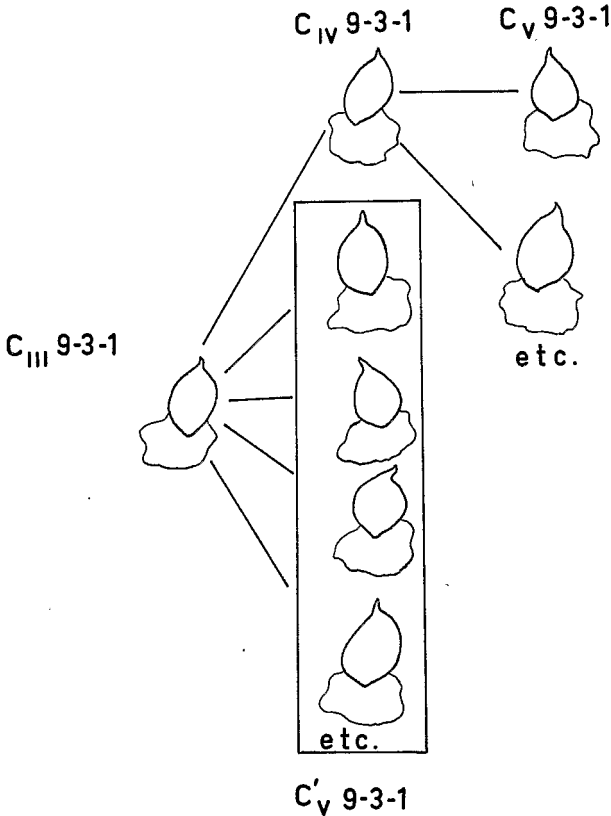


Fig. 1. Schéma indiquant l'échantillonnage des larves mesurées. Parmi la descendance d'une des femelles retenues dans la troisième génération ($C_{III-9-3-1}$), une femelle ($C_{IV-9-3-1}$) était choisie pour continuer l'élevage. L'échantillonnage était fait dans l'ensemble des larves ($C'_{V-9-3-1}$) produites par les autres femelles.

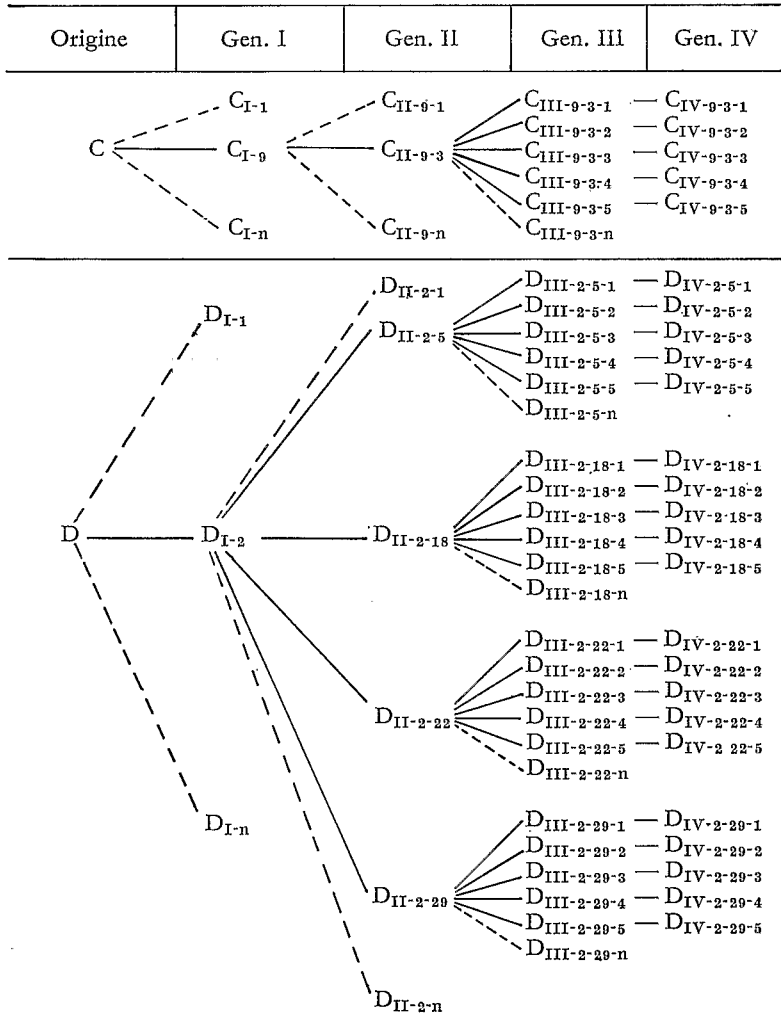
éclore ensemble, puis tuées, fixées, montées et mesurées. Il s'agit donc des larves cousines provenant de plusieurs femelles soeurs qui elles-mêmes avaient évidemment la même mère. La désignation $C_{V-9-3-1}$ indique donc l'ensemble de cousins ayant comme grandmère $C_{III-9-3-1}$ (voir Fig. 1).

ANALYSE STATISTIQUE

Modèle général

La variabilité d'un caractère parmi les individus d'une population peut être la résultante de deux facteurs d'hétérogénéité: hérédité et milieu.

TABLEAU I
Généalogie des lignées endogamiques d'*Heterodera oryzae*



Le schéma généalogique ci-dessus (Tableau I) conduit, à l'intérieur de chaque niveau à une plus grande homogénéité génétique, l'hétérogénéité due au milieu restant inchangée. Cette augmentation d'homogénéité est causée par un degré d'homozygotie toujours plus important parmi les individus élevés pendant plusieurs générations en maintenant un niveau d'endogamie assez strict (le niveau d'endogamie le plus complet étant l'autofécondation).

Dans le Tableau II la moyenne de la longueur des larves et la variance correspondante de chaque lignée sont groupées pour la cinquième et sixième génération d'endogamie. A première vue on constate que la longueur des larves descendant de Ce est nettement plus petite que celle des larves descendant de D. Il semble donc justifié de supposer que les différences de longueur entre ces deux groupes sont en partie d'origine génétique.

Evaluer l'importance des différentes données à l'intérieur de ces deux catégories est beaucoup plus difficile et il est nécessaire d'avoir recours aux méthodes statisti-

TABLEAU II

Moyenne de longueur des larves (L) et leur variance correspondante (écart type de la moyenne) des lignées endogamiques d'*Heterodera oryzae*

5ème génération			6ème génération		
Lignée	L	écart type de la moyenne	L	écart type de la moyenne	Lignée
C _{V-9-3-1}	400	2,7	400	4,0	C _{VI-9-3-1}
C _{V-9-3-2}	394	3,3	392	4,8	C _{VI-9-3-2}
C _{V-9-3-3}	401	3,4	401	4,0	C _{VI-9-3-3}
C _{V-9-3-4}	390	3,8	384	3,0	C _{VI-9-3-4}
C _{V-9-3-5}	422	4,2	398	3,0	C _{VI-9-3-5}
D _{V-2-5-1}	441	3,1	439	3,2	D _{VI-2-5-1}
D _{V-2-5-2}	433	3,2	420	3,5	D _{VI-2-5-2}
D _{V-2-5-3}	445	3,2	447	3,9	D _{VI-2-5-3}
D _{V-2-5-4}	455	4,1	427	4,7	D _{VI-2-5-4}
D _{V-2-5-5}	456	4,1	449	3,6	D _{VI-2-5-5}
D _{V-2-18-1}	427	3,3	419	3,4	D _{VI-2-18-1}
D _{V-2-18-2}	411	3,9	434	3,5	D _{VI-2-18-2}
D _{V-2-18-3}	434	3,0	419	2,9	D _{VI-2-18-3}
D _{V-2-18-4}	430	2,8	424	3,1	D _{VI-2-18-4}
D _{V-2-18-5}	433	3,1	401	3,0	D _{VI-2-18-5}
D _{V-2-22-1}	418	3,7	420	2,7	D _{VI-2-22-1}
D _{V-2-22-2}	437	3,9	433	3,2	D _{VI-2-22-2}
D _{V-2-22-3}	443	3,7	425	3,0	D _{VI-2-22-3}
D _{V-2-22-4}	439	3,2	440	1,8	D _{VI-2-22-4}
D _{V-2-22-5}	430	4,3	423	5,1	D _{VI-2-22-5}
D _{V-2-29-1}	433	3,7	434	2,6	D _{VI-2-29-1}
D _{V-2-29-2}	436	3,4	442	2,4	D _{VI-2-29-2}
D _{V-2-29-3}	419	2,8	426	4,0	D _{VI-2-29-3}
D _{V-2-29-4}	420	3,4	432	3,0	D _{VI-2-29-4}
D _{V-2-29-5}	416	3,8	428	2,7	D _{VI-2-29-5}

ques pour arriver à une bonne estimation de l'influence du milieu et pour pouvoir apprécier l'effet des différents niveaux d'homogénéité (déterminés par le degré de consanguinité des différentes lignées).

La méthode d'analyse de variance décrite par Kempthorne (1957) et Scheffé (1959) est particulièrement adaptée à cette situation et permet d'estimer:

s_e^2 variance résiduelle entre individus (cousins) qui sont issus de masses d'oeufs produites par des soeurs, niveau de plus grande uniformité génétique; s_e^2 contient l'hétérogénéité génétique résiduelle et la variabilité due au milieu.

s_m^2 variance des mères de ces différents groupes de femelles soeurs (donc grand-mères des larves mesurées), d'une même origine.

s_p^2 variance des individus de seconde génération retenus pour la continuation mères des larves mesurées), d'une même origine.

(C_{II-9-3}, D_{II-2-5}, etc.).

$s_g^2 = s_e^2 + s_m^2 + s_p^2$ représente l'estimation de la variance globale pour une mesure de longueur pour l'ensemble des individus étudiés.

$\frac{s_e^2}{s_g^2}$, $\frac{s_m^2}{s_g^2}$, $\frac{s_p^2}{s_g^2}$ représentent les rapports de la variance entre cousins, de la variation entre grand-mères soeurs, de la variance entre les mères de ces dernières avec

la variance globale $\rho = \frac{s_m^2 + s_p^2}{s_g^2}$ est la corrélation intra-classe entre cousins.

$\frac{s_m^2 + s_p^2}{s_g^2} = 1 - \frac{s_e^2}{s_g^2}$; s'il n'existait plus aucune source de variation à l'intérieur d'une même masse d'oeufs (identité génétique, pas de variation de milieu) tous ces individus seraient identiques et ce coefficient serait égal à l'unité. Il est par contre nul s'il n'existe pas d'autres différences entre origines et entre mères que celle dues au milieu ($s_m^2 = s_p^2 = 0$).

Ces estimations résultant du modèle suivant:

l_{ijk} = longueur de l'individu k , descendant de la grand-mère j , originaire de i .

$l_{ijk} = \lambda + p_i + m_{ij} + e_{ijk}$

λ = longueur moyenne de l'ensemble des individus étudiés.

p_i = écart de la longueur due à l'origine i , ($\lambda + p_i$) est équivalent à la longueur moyenne de tous les individus apparentés à l'origine.

m_{ij} = écart à la moyenne due à la grand-mère j , originaire de i .

e_{ijk} = écart propre à l'individu avec ses cousins issus de la même grand-mère ij .
 e est le seul terme représentant le milieu.

Soit: ω le nombre de fondateurs de la deuxième génération,

$i \in (1, \omega)$

μ le nombre de grand-mères, $j \in (1, \mu)$

ε le nombre de cousins mesurés, $k \in (1, \varepsilon)$

$$\bar{L} = \frac{\sum_i \sum_j \sum_k l_{ijk}}{\omega \mu \epsilon}$$

$$\bar{L}_{ij} = \frac{\sum_k l_{ijk}}{\epsilon}$$

$$\bar{L}_i = \frac{\sum_j \sum_k l_{ijk}}{\mu \epsilon}$$

$$T = \sum l_{ijk}^2 - \omega \mu \epsilon \bar{L}^2$$

$$S_2 = \sum l_{ijk}^2 - \mu \epsilon \sum \bar{L}_i^2$$

$$S_1 = \sum l_{ijk}^2 - \epsilon \sum \bar{L}_{ij}^2$$

TABLEAU III

Analyse de variance hiérarchique

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	Espérances des carrés moyens
P = fondateurs deuxième génération	T-S ₂	ω-1	$\frac{T-S_2}{\omega-1}$	$s_e^2 + \epsilon s_m^2 + \mu \epsilon s_p^2 = a$
M = entre grand-mères soeurs	S ₂ -S ₁	ω (μ-1)	$\frac{S_2-S_1}{\omega (\mu-1)}$	$s_e^2 + \epsilon s_m^2 = b$
R = entre individus descendant de la même grand-mère (cousins)	S ₁	ωμ (ε-1)	$\frac{S_1}{\omega \mu (\epsilon-1)}$	s_e^2
Total	T	ωμ ε-1		

On estimera s_m^2 et s_p^2 par:

$$s_m^2 = \frac{b - s_e^2}{\epsilon}; \quad s_p^2 = \frac{a - b}{\mu \epsilon}$$

Resultats

A. Le Tableau IV donne l'analyse de variance calculée sur tous les individus appartenant à toutes les origines (C et D) de la cinquième génération.

Conclusions: 1°) Il existe une différence hautement significative entre les grand-mères soeurs d'une même origine. 2°) Il existe une différence hautement significative entre les fondateurs de la deuxième génération.

Ces différences se lisent sur les descendances et sont donc dues à des caractéristiques transmissibles de génération à génération. La majeure partie de la variation transmissible héréditairement est observée au niveau des fondateurs de la deuxième génération; il existe cependant une variabilité encore hautement significative dans l'échantillonnage des grand-mères soeurs. La moitié de la variance individuelle d'ensemble est due à ces deux facteurs (un résidu héréditaire peut en outre exister encore dans s_e^2).

B. Dans le Tableau V l'analyse de variance est effectuée sur les individus de la cinquième génération appartenant uniquement à l'origine D.

TABLEAU VI

Analyse de variance de longueur des larves de la sixième génération appartenant aux origines C et D

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	F calculé	F tabulé	
					0,05	0,01
P	161862	4	40.465,50	19,07	2,87	4,43
M	42438	20	2.121,90	5,94	1,60	1,93
R	258870	725	357,06			
Totale	463170	749				

$$s_p^2 = 255,62$$

$$\text{Parts de variation dues à } p = 38,1\%$$

$$s_m^2 = 58,83$$

$$m = 8,8\%$$

$$s_e^2 = 357,06$$

$$e = 53,2\%$$

$$\text{corrélation intra-classe } \rho = 46,8\%$$

Conclusions: La génération d'endogamie supplémentaire n'a pas sensiblement modifié les conclusions. La variance résiduelle n'a que très légèrement diminuée, montrant ainsi un bon niveau de stabilisation génétique des lignées endogamiques. La légère baisse de la variabilité extraite par m peut être due à des accidents d'échantillonnage fortuits. Ces résultats confirment les analyses précédentes et renforcent la valeur des données.

DISCUSSION

La longueur des larves d'*Heterodera* a déjà fait l'objet de plusieurs études. L'influence de différentes méthodes d'échantillonnage, d'extraction de larves des kystes et les différentes façons de tuer, fixer et monter les nématodes sur la longueur a fait l'objet d'un article très détaillé de la part de Fenwick et Franklin (1942). Une de leurs observations les plus importantes est que la longueur des larves dépend du temps écoulé entre l'éclosion et le moment où l'on fixe les larves. Muller (1958) et Kämpfe (1960) ont confirmé ces observations chez *H. rostochiensis*. Les mêmes phénomènes étaient observés par Kämpfe chez *H. schachtii*. Pendant les quatre premières heures après l'éclosion, la longueur des larves augmente considérablement, ensuite leurs dimensions ne sont pas soumises à des changements importants. Selon Kämpfe le degré d'humidité des kystes a une influence importante sur l'augmentation de longueur au cours des premières heures suivant l'éclosion. De plus la température utilisée pour tuer les nématodes qui se trouvent dans l'eau influe sur la longueur (Fenwick & Franklin, 1942).

Par les méthodes utilisées dans cette étude, les masses d'oeufs et les larves provenant de ces masses d'oeufs ont subi un traitement très uniforme et c'est grâce à cette uniformité qu'on a pu démontrer l'influence de caractéristiques héréditaires, l'influence du milieu (et l'hétérogénéité génétique résiduelle) s'élevant à 53,2% de la variance totale dans les deux générations étudiées.

La longueur des larves est partiellement déterminée par des caractéristiques

héréditaires transmissibles par les mères. Dès la troisième génération d'endogamie il ne semble plus rester de variabilité génétique résiduelle importante.

Dans chaque groupe de grand-mères soeurs une diversité génétique pour le caractère longueur de larves est démontrée, mais la diversité la plus importante existe entre les fondateurs de la deuxième génération, particulièrement entre ceux appartenant à la série d'origine C et de la série D.

La fixation génétique initiale entre C et D, pour sa part fixable doit être déterminée par un système génétique assez peu complexe puisqu'elle est obtenue par un nombre faible de générations.

Il est remarquable d'obtenir une diversification génétique aussi importante à partir d'un échantillonnage initial aussi restreint (2 animaux) ce qui montre la nécessité d'établir la diversité des populations naturelles avant d'élaborer une taxonomie à partir de caractères quantitatifs. Notons, d'un point de vue évolutif, comment un très petit nombre de fondateurs permet cependant la réalisation d'une variance génétique importante (le faible nombre de fondateurs livre peu d'allèles par locus mais le système concernant plusieurs loci permet l'entretien d'une variation non négligeable).

L'analyse de variance est un bon outil qui permet d'estimer la contribution génétique des parents à la variabilité de leur descendance. Des études portant sur la longueur des larves d'*Heterodera sacchari* et *Meloidogyne javanica* sont en cours. Les observations sur ces deux espèces parthénogénétiques permettent d'estimer l'influence du milieu sur des individus génétiquement identiques. Surtout par l'étude de *M. javanica* élevé monoxéniquement sur cultures de racines de tomate, il sera possible d'apprécier la variabilité d'une souche élevée sous des conditions rigoureusement stables.

Les auteurs expriment leur remerciement à Mr. Bernard Souchaud qui a effectué tous les montages et à Mr. Gnahore Gohi Marcel qui a entretenu les lignées des nématodes.

SUMMARY

Study of the influence of genetic constitution on the length of larvae of Heterodera oryzae

Larvae from two egg-masses (C and D) of *Heterodera oryzae* were separately inoculated on rice. In this way a number of full sibs (sisters inseminated by their brothers) were obtained. Repeating this process during subsequent generations led to the establishment of five families each consisting of five inbred lines. One family originated from C, the other four from D. The relationship between the different lines is shown in Table I.

In the fifth and sixth generation most of the larvae descending from the same grandmother were killed and fixed together (see fig. 1). From each line a sample of 30 larvae was mounted on slides and the length of each animal was measured. One cousin of each sample in the fifth generation was selected to continue each of the 25 lines into the sixth generation. Great care was taken to give the different inbred lines a uniform treatment during these operations in order to reduce variability due to other than genetic causes to the bare minimum.

The planning of the experiment permitted the use of a hierarchical analysis of variance and it was possible to estimate the contribution of each preceding generation to the variability of the length of the larvae.

There is a highly significant difference between the two lines chosen for experimental inbreeding. Inbreeding for a fourth generation diminishes residual variance only slightly, indicating that almost no residual genetic variability remains after three generations of inbreeding.

The great difference in larval length between the offspring of C and those of D emphasizes the need to determine the variability in natural populations before adopting a taxonomy based on quantitative characters.

BIBLIOGRAPHIE

- DROPKIN, V. H., MARTIN, G. C. & JOHNSON, R. W. (1958). Effect of osmotic concentration on hatching of some plant parasitic nematodes. *Nematologica* **3**, 115-126.
- FENWICK, D. W. & FRANKLIN, M. T. (1942). Identification of *Heterodera* species by larval length. Technique for estimating the constants determining the length variations within a given species. *J. Helminth.* **20**, 67-114.
- KÄMPFE, L. (1960). Über den Wert von Schwanzform und Körpermassen für die Arttdiagnose der Nematoden (dargestellt an der Gattung *Heterodera*). *Nematologica, Suppl. II*, 112-122.
- KEMPTHORNE, O. (1957). *An introduction to genetic statistics*, Wiley. New York, London, Sydney.
- LUC, M. & BERDON-BRIZUELA, R. (1961). *Heterodera oryzae* n. sp. (Nematoda: Tylenchoidea) parasite du riz en Côte d'Ivoire. *Nematologica* **6**, 272-279.
- MULLER, G. (1958). Morphologische Untersuchungen zur Variabilität der Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis*. *Biol. Zbl.* **77**, 673-714.
- NETSCHER, C. (1970). A rapid technique for mass-killing nematodes with hot fixative. *Nematologica* **16**, 603.
- NETSCHER, C. & SEINHORST, J. W. (1969). Propionic acid better than acetic acid for killing nematodes. *Nematologica* **15**, 286.
- SCHEFFÉ, H. (1959). *The analysis of variance*. Wiley, New York, London, Sydney.